

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENDOTOXIN

Publication number: JP61093958

Publication date: 1986-05-12

Inventor: GOTO TATSUO; FUTOU ATSUSHI

Applicant: DAICEL CHEM

Classification:

- international: G01N33/86; C12Q1/00; G01N21/83; G01N33/579;
G01N33/86; C12Q1/00; G01N21/77; G01N33/579;
(IPC1-7): C12Q1/00; G01N33/86

- European: G01N33/579

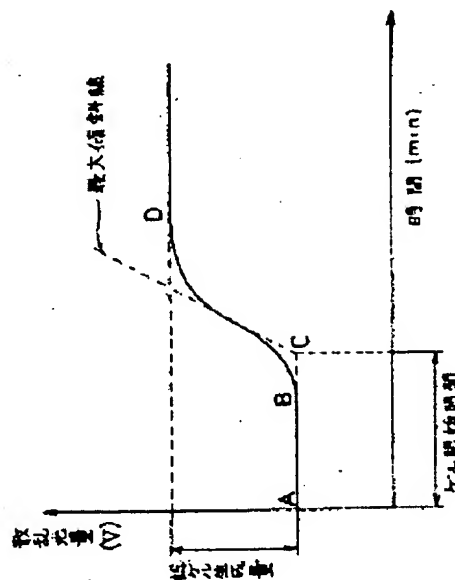
Application number: JP19840214928 19841013

Priority number(s): JP19840214928 19841013

Report a data error here

Abstract of JP61093958

PURPOSE: To determine quantitatively endotoxin with high sensitivity and high accuracy by bringing a Limulus amoebocyte lysate reagent into reaction with a specimen to induce gelation, determining the gel initiation time from the quantity of the light scattered from the gel and comparing the same with the gel initiation time of the endotoxin having a known concn. **CONSTITUTION:** The time when the Limulus amoebocyte lysate reagent is added to the specimen is determined as the test start point and the time between A-C when the intersected point C of the extrapolation line drawn from said point in parallel with the axis of abscissa (time axis min) and the max. inclination line between the gelation initiation point B and the gelation end point D is set is determined as the gel start time in the stage of determining quantitatively the endotoxin which induces flush pyrexia when mixed with an injection drug, etc. The gelation phenomenon is outputted to a recorder by measuring the change of the quantity of the scattered light by using a device for measuring the quantity of the scattered light and the gelation initiation time is determined by calculation from the output data. The exact quantitative determination is made possible with high sensitivity by using the calibration curve obtd. preliminarily in the same manner with the sample having a known concn.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-93958

⑮ Int. Cl.

G 01 N 33/86
C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号

8305-2G
8213-4B

⑬ 公開 昭和61年(1986)5月12日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 エンドトキシンの定量法

⑯ 特 願 昭59-214928

⑰ 出 願 昭59(1984)10月13日

⑱ 発 明 者 後 藤 達 乎 姫路市の形町の形1188-78

⑲ 発 明 者 府 藤 篤 姫路市余部区上余部500

⑳ 出 願 人 ダイセル化学工業株式 堺市鉄砲町1番地
会社

㉑ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

明 細 書

1. 発明の名称

エンドトキシンの定量法

2. 特許請求の範囲

1. 検体にリムラス・アマーボサイト・ライセート試薬を反応させてゲル化を起こさせ、その光散乱光量を測定してゲル開始時間を求め、既知濃度のエンドトキシンのゲル開始時間と比較して、検体中のエンドトキシン濃度を定量することを特徴とするエンドトキシンの定量法。

3. 発明の詳細な説明

(ハ) 考案の目的

(産業上の利用分野)

この発明は、エンドトキシンの定量法に関する。さらに詳しくは発熱性物質(バイロジエン)の原因物質の一つであるエンドトキシンの定量法に関する。

(従来技術)

注射剤及び医療用具の製造工程等で予期せずして混入する発熱性物質(バイロジエン)は、多く

の場合エンドトキシン(リポ多糖類)であると考えられており、臨床面でもエンドトキシン血症の問題、エンドトキシン汚染を原因とする注射事故、手術事故の問題も比較的多く、エンドトキシン検出の必要性が増してきている。

現在、エンドトキシンの検出法として、リムラステスト・ゲル化法と発色性合成基質法が使われており、両方法ともカプトガニの血球成分(リムラス・アマーボサイト・ライセート)を利用したものである。これらの方法は、カプトガニの血球中に存在する前凝固性酵素(Proclotting Enzyme)をエンドトキシンが活性化し、活性化酵素(Clotting Enzyme)とするもので、ゲル化法ではカプトガニ血球中に存在している凝固性蛋白(Coagulogen)に前記活性化酵素が作用して、3種類のペプチドA、B、Cを生成する。ペプチドAとBはS-S結合するが、この際に肉眼で見える“ゲル”を形成するので、これを指標としてエンドトキシンの陽性・陰性を判定するという半定量的方法である。もう一方の発色性合成基質法は、ゲル化法と原

理は同じであるが、上記凝固性蛋白に代つて発色性の合成基質を用いる方法である。この合成基質には、種々の物質が検討されているが、例えば有効な基質部分オリゴペプチドにパラニトロアニリン (PNA) を結合させたものが現在市販されている。この基質にエンドトキシンにより活性化された酵素が作用するとパラニトロアニリンを遊離して、反応液は黄色となる。遊離パラニトロアニリンと添加エンドトキシン量は比例するので、黄色を吸光度 (OD 405 nm) で測定してエンドトキシン量を定量することが出来る。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、以上2つの検出法において、ゲル化法は簡便で検出感度が高いが、定量性に欠けるという問題点があり、発色性合成基質法ではエンドトキシンの定量が可能であり、検出感度も高いが、手間がかかりかつダイナミツクレンジが狭いという問題点があった。

この発明は、上記問題点を解決すべくなされたものであり、簡便で検出感度が高くかつダイナミ

ツクレンジの広いエンドトキシンの定量法を提供しようとするものである。

本発明者らは、鋭意研究の結果、まず前記ゲル化法におけるゲル成長過程の状態が、ゲル層の光散乱光量を電氣的に検出して得られる電気信号の変化から簡便に知りうることを見出した。そしてさらに研究の結果、この光散乱光量の変化には第1図に示すごとき一定のパターンが認められる点を見出し、これに基づいてエンドトキシンの定量を行なう点に慧著し、この発明に到達した。

(ロ) 発明の構成

かくしてこの発明によれば、検体にリムラス・アマーボサイト・ライセート試薬を反応させてゲル化を起こさせ、その光散乱光量を測定してゲル開始時間を求め、既知濃度のエンドトキシンのゲル開始時間と比較して、検体中のエンドトキシン濃度を定量することを特徴とするエンドトキシンの定量法が提供される。

この発明における「ゲル開始時間」とは、ゲル化反応における光散乱光量の変化を示す第1図の

ごときグラフにおける、テスト開始点 (A ; リムラス・アマーボサイト・ライセート試薬添加時) から横軸に平行に引いた外挿線と、ゲル化開始点 (B) とゲル化終了点 (D) の間の最大傾斜線との交点 (C) を設定した際の (A) - (C) 間の時間を意味する。

この発明の最も特徴とする点は、上記で定義される「ゲル開始時間」が、検体中のエンドトキシン濃度に最も相関関係があることを見出した点にある。

このようにして設定したゲル開始時間を、まず種々の既知濃度のエンドトキシンについて求め、それを指標とし、それと未知濃度のエンドトキシンを含む検体について求めたゲル開始時間とを比較すれば、検体中の未知濃度のエンドトキシン濃度を定量することができる。

この発明に用いるリムラス・アマーボサイト・ライセート試薬としては、従来のエンドトキシン検出用のリムラス・アマーボサイト・ライセートをエンドトキシンフリーの蒸留水に溶解したもの

をそのまま用いることができる。またこの発明の対象とする検体は、液状のものはそのまま又は希釈した被検液として反応に供せられ、液状以外のものは、適宜エンドトキシンフリーの蒸留水に溶解又は抽出した被検液として反応に供せられる。

かかる検体又は被検液とリムラス・アマーボサイト・ライセート試薬の反応は、エンドトキシンフリーのガラス製反応容器中、これらを混合することにより行なわれる。通常、37℃前後の温度下で放置して反応させるのが適しており、また混合液の pH は6~8となるように設定するのが適している。

この発明における光散乱光量の変化は、適当な光散乱光量測定装置を用いて測定でき、この装置は専用機を用いてもよく、また汎用フォトメーターを用いてその場で構成してもよい。ただし、少なくとも前記反応容器をそのまま測定セルとして測光位置に設定でき、かつ測定部が37℃前後に恒温化され更に光散乱光量を連続的に出力できるよう構成されていることを要する。更に反応容器

としては、試薬量ができるだけ少なくすむようになるべく少量のものが好ましい。このような観点から、最も好ましい光散乱光量測定装置として光散乱光検知式のいわゆる血液凝固分析装置を用いることができ、その例としては、コアグ・スタット（国際試薬株式会社製）が挙げられる。

なお、かような光散乱光量測定装置に、マイクロプロセッサを用いたゲル開始時間自動演算器及びエンドトキシン濃度換算器とリンクすれば、自動測定が可能となる。かような自動演算は、出力変化の最大変化率を求める比較アルゴリズムと計算式とから容易にプログラム設定することができ、濃度換算は検量線からのファクター計算及びデータ入力により容易にプログラム設定することができる。

また第5図に示した様に、総ゲル生成量は反応液中の凝固性蛋白濃度に比例することも見出した。このことから1回の試薬に要する試薬の量を減らすことも可能であり、コスト的にも有効な方法であることがわかる。

タット：国際試薬株式会社製）にて、ゲル化時の光散乱光量の変化を測定し、記録計に出力し、出力されたデータをもとにしてゲル開始時間を求めた。実験は2回行ない、その結果を第1表に示した。

第1表

エンドトキシン濃度 (ng/ ml)	ゲル開始時間 (分)	
	第1回目	第2回目
100	4.25	4.42
10	7.00	7.50
1.0	11.2	11.0
0.1	18.5	18.4
0.05	22.2	22.0
0.02	28.6	28.6
0.01	37.0	30.5

この結果をもとにして第2図に示す検量線を作成した。縦軸は対数目盛で表示したゲル開始時間(分)、横軸は同じく対数目盛で表示したエンドトキシン濃度 (ng/ ml) である。なお、グラフ

(実施例)

以下、実施例で本発明を詳説するが、これによってこの発明は限定されるものではない。

実施例1

(エンドトキシン濃度とゲル開始時間との相関)

ゲル開始時間とエンドトキシン濃度との相関関係を求めるために、エンドトキシンに標準リポポリサッカライド (E.coli UKT-B) を使用して各エンドトキシン濃度におけるゲル開始時間を測定した。

まず、リムラス・アマーボサイト・ライセート (カプトガニ血球抽出物凍結乾燥品：和光純薬工業KK製) にエンドトキシンプリーの水5 mlを無菌的に加え静かに振り混ぜ完全に溶解し、リムラス・アマーボサイト・ライセート試薬とした。次いで光散乱光量測定装置 (コアグスタット) 用試験管を250℃、2時間で乾燥熱滅菌しておき、該試験管に上記試薬を0.2 ml注入し、その中へ各既知濃度のエンドトキシン含有液0.2 mlをそれぞれ添加し、光散乱光量測定装置 (コアグ・ス

の○は第1回目を、△は第2回目の実験結果を示す。

また、第1表中第1回目の測定データの中でエンドトキシン濃度が100、1、0.02ng/ mlのもの散乱光量とゲル開始時間との関係を求めた記録計のチャートを例として第3図(a)、(b)及び(c)に示した (図中、縦軸は散乱光量を電圧出力mVで表示したもの、横軸は時間を示す)。

実施例2

エンドトキシン既知濃度の液の代わりに姫路市の上水道水を用いた以外は実施例1と同じ方法で測定し、第4図のようなチャートが得られた。このチャートを基にして、実施例1で述べた手法でゲル開始時間を求めたところ、8.4分という値が得られた。第2図の検量線によりこの値から、この水道水のエンドトキシン濃度は4.4ng/ mlということがわかった。これは、従来法による経験的な数値と同程度のものではあった。

なお、コアグスタットでの光散乱光量測定に液量が0.3 ml以上必要であるために、今回は試液

0.2 ml、サンプル液 0.2 ml としたが、試液 0.1 ml、サンプル液 0.2 ml でもよく、また装置が変わればそれらの量を任意に選ぶことが可能である。

このようにして未知濃度のエンドトキシンを含む検体のゲル開始時間を、前記で作成した検量線と比較することにより、検体のエンドトキシン濃度を容易に求めることができる。

(ハ) 発明の効果

この発明の方法によれば、簡便で検出感度の高いゲル化法では困難であつたエンドトキシン濃度の定量を正確・簡単に行うことができ、また発色性合成基質法に比べてダイナミックレンジが広い等の優れたものとなる。

また、マイクロプロセッサを用いた自動化も容易であるという効果も備えている。

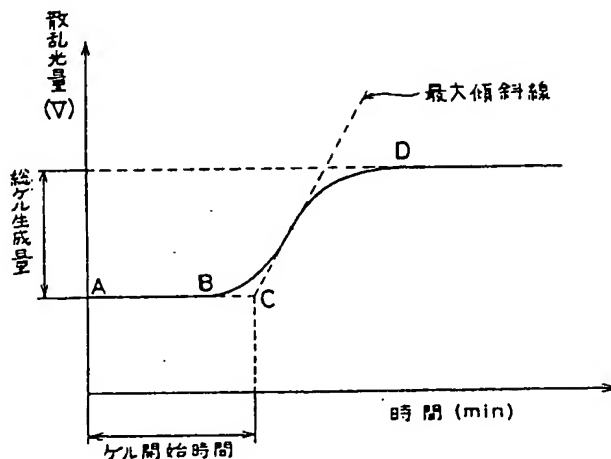
4. 図面の簡単な説明

第1図は、散乱光量と時間との関係からゲル開始時間を求めるためのグラフ、第2図は、ゲル開始時間とエンドトキシン濃度との相関関係を求め

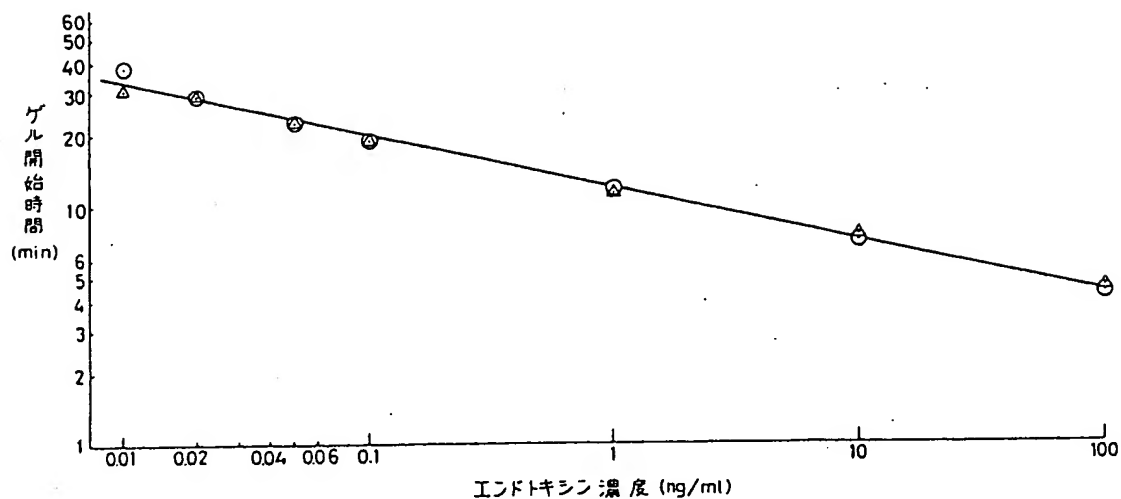
た検量線、第3図(a)、(b)及び(c)は、本発明の実施例1の第1図相当図、第4図は実施例2の第1図相当図、第5図は、凝固性蛋白濃度とゲル生成量との関係を示すグラフである。

代理人 弁理士 野 河 信 太 郎

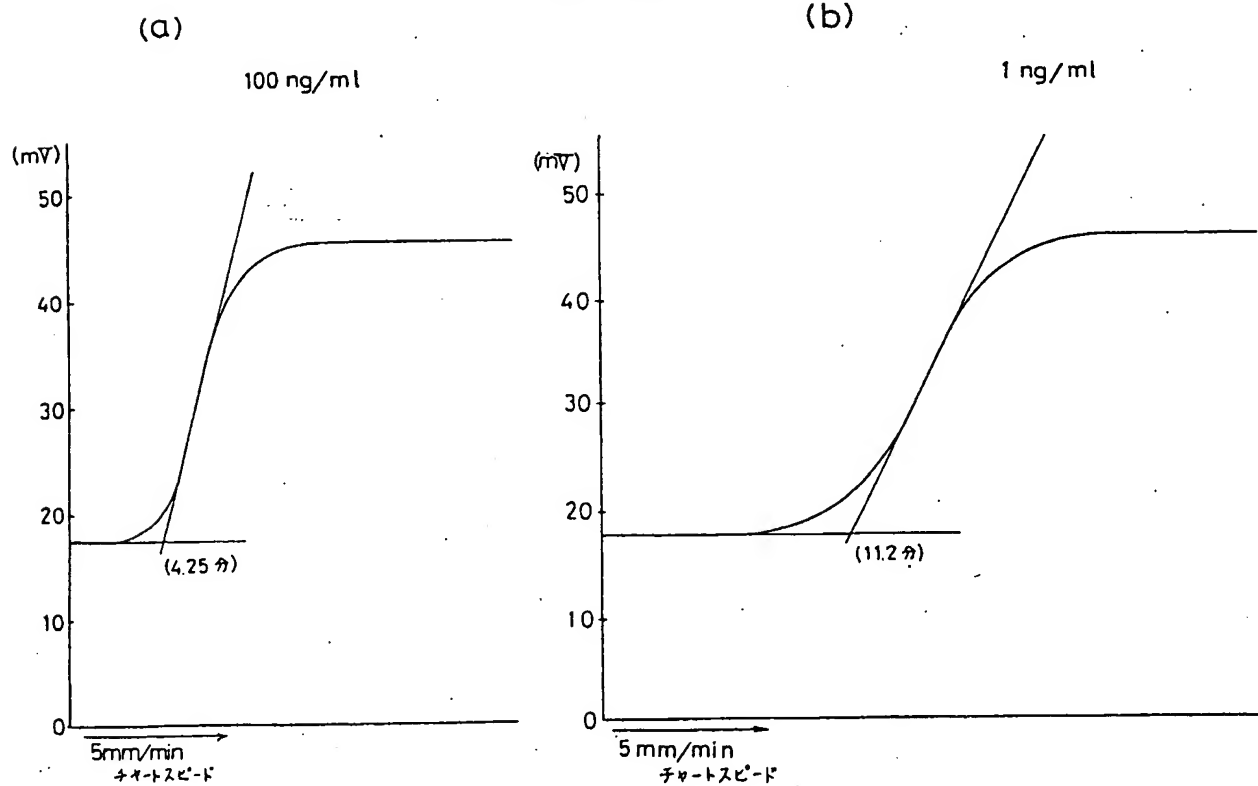
第 1 図



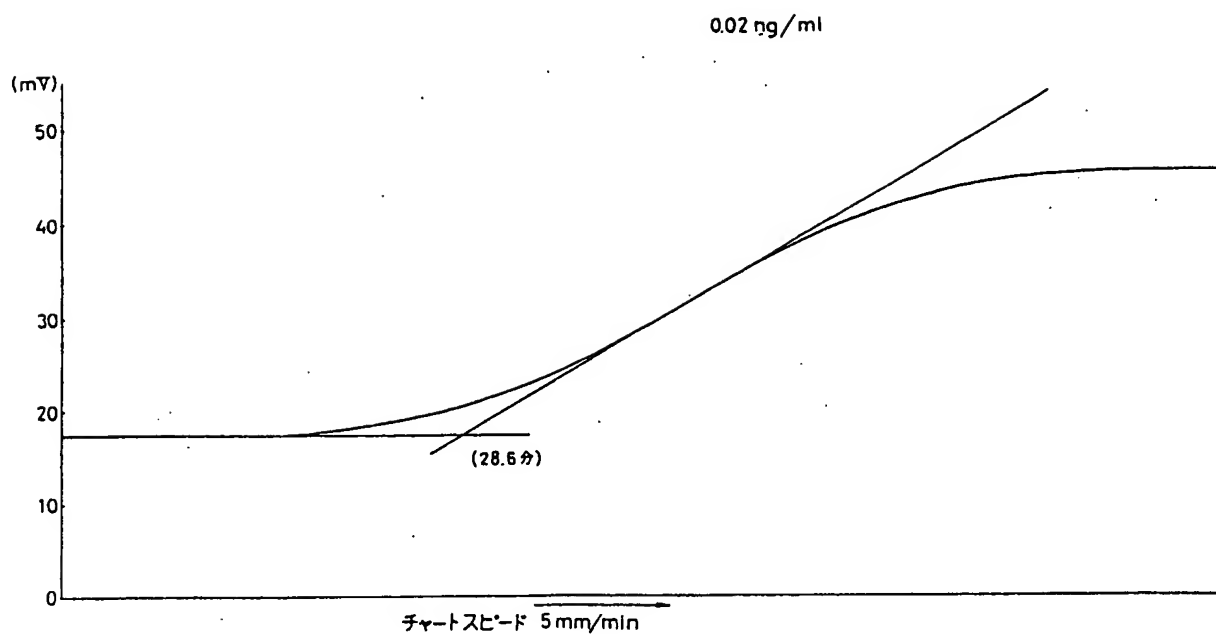
第 2 図



第 3 図

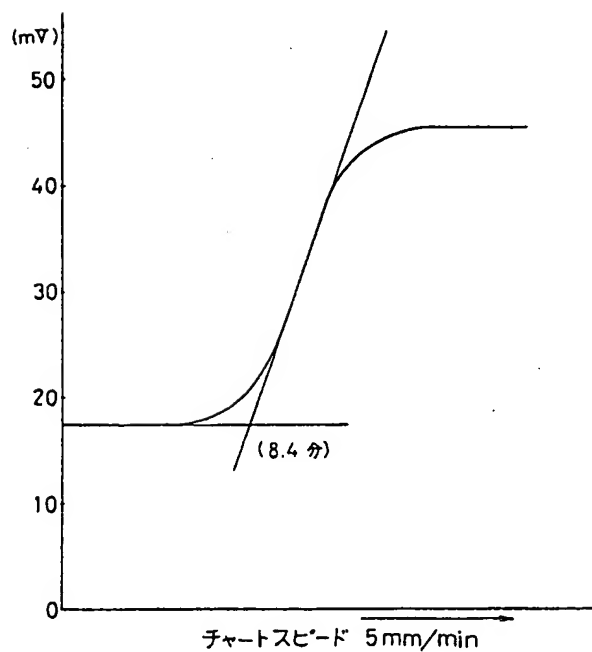


第 3 図 (c)



第 4 図

市 水 (4.4 ng/ml)



第 5 図

